

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra biofyziky a fyzikální chemie**



**Stanovení potenciálních léčiv v biologickém materiálu**

Diplomová práce

**Determination of Potential Drugs in Biological Matrices**

Diploma Thesis

Vedoucí diplomové práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové, 2014

Jana Suchardová

### **Prohlášení:**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 13.5.2014

.....  
Jana Suchardová

### **Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Vladimíru Kubíčkovi, CSc. za cenné rady a trpělivost při tvorbě mé diplomové práce.

## **Abstrakt:**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Jana Suchardová

Vedoucí práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název diplomové práce: Stanovení potenciálních léčiv v biologickém materiálu

Cílem této práce bylo najít vhodné podmínky pro HPLC stanovení látky VN 014 v biologickém materiálu. Experimenty probíhaly na čtyřech core-shell kolonách (Ascentis<sup>®</sup> Express F5, Ascentis<sup>®</sup> Express C18, Ascentis<sup>®</sup> Express Phenyl–Hexyl, Ascentis<sup>®</sup> Express RP–Amide) s různými mobilními fázemi. V práci byla dále testována úprava vzorku s využitím metod SPE a LLE.

Nejllepších výsledků bylo dosaženo na koloně Ascentis<sup>®</sup> Express RP–Amide při použití mobilní fáze složené z 0,03 mol/l roztoku kyseliny mraveční a methanolu. Pro úpravu biologického vzorku se osvědčila metoda LLE.

*Klíčová slova:* HPLC, core-shell kolony, SPE, LLE, RP-Amide

## **Abstract:**

Charles University of Prague

Fakulty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Jana Suchardová

Consultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

The aim of this diploma thesis was to find suitable conditions for HPLC determination of VN 014 in biological matrices. Experiments were carried out on four core-shell columns (Ascentis<sup>®</sup> Express F5, Ascentis<sup>®</sup> Express C18, Ascentis<sup>®</sup> Express Phenyl-Hexyl, Ascentis<sup>®</sup> Express RP-Amide) with different mobile phases. In this thesis two extraction methods were also tested – solid phase extraction and liquid-liquid extraction.

The best results were achieved on Ascentis<sup>®</sup> Express RP-Amide column with the mobile phase composed of 0.03 mol/l formic acid and methanol. LLE method was chosen for the sample preparation.

*Key words:* HPLC, core-shell columns, SPE, LLE, RP-Amide

## **Obsah:**

1. Úvod a zadání práce.....	7
2. Teoretická část.....	9
2.1 Bronchodilatancia.....	10
2.1.1 $\beta_2$ -sympatomimetika.....	10
2.1.2 Parasympatolytika.....	11
2.1.3 Metylxantiny.....	11
2.1.4 Antileukotrieny.....	12
2.2 Chromatografie.....	13
2.2.1 Plynová chromatografie.....	13
2.2.2 Kapalinová chromatografie.....	14
2.2.2.1 Tenkovrstvá chromatografie.....	14
2.2.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	14
2.3 Úprava biologického vzorku před analýzou.....	17
2.4 Validace analytických metod.....	18
3. Experimentální část.....	19
3.1 Použité chemikálie.....	20
3.2 Použité přístroje.....	21
3.3 Příprava vzorků.....	22
3.4 Použité mobilní fáze.....	23
4. Výsledky.....	25
4.1 Kolona Ascentis® Express F5.....	26
4.2 Kolona Ascentis® Express C18.....	28
4.3 Kolona Ascentis® Express Phenyl–Hexyl.....	29
4.4 Kolona Ascentis® Express RP–Amide.....	31
4.5 Validace.....	37
5. Diskuze.....	39
6. Závěr.....	43
7. Seznam použitých zkratk.....	45
8. Použitá literatura.....	47

## **1. Úvod a zadání práce**

Katedra farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové se zabývá studiem potenciálních antiastmatik odvozených ze struktury chinazolinových alkaloidů. Jedním z nich je i látka VN014. Při výzkumu nových léčivých látek je důležité najít optimální metodu pro jejich analýzu v biologickém materiálu.

Cílem mé diplomové práce bylo nalezení vhodných chromatografických podmínek pro stanovení zkoumané látky s využitím core-shell kolon. Dále jsem testovala i úpravu biologického materiálu před vlastní HPLC analýzou metodami extrakce na pevné fázi (SPE) a extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE).



## **2.Teoretická část**

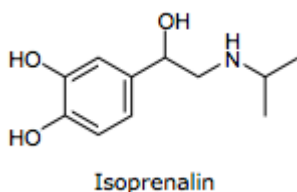
## 2.1 Bronchodilatancia

Bronchodilatancia jsou látky rozšiřující bronchy. Používají se k terapii průduškového astmatu a chronické obstrukční plicní nemoci (dále CHOPN). Podle doby působení je rozdělujeme na krátkodobě a dlouhodobě účinné látky. Krátkodobě účinná bronchodilatancia se podávají při akutních příznacích astmatu a CHOPN. Patří mezi ně  $\beta_2$ -sympatomimetika s krátkým biologickým poločasem, parasympatolytika a xantiny. Dlouhodobě účinná bronchodilatancia se užívají k terapii nočních projevů onemocnění a při léčbě perzistujícího astmatu v kombinaci s protizánětlivými léčivy. Řadíme k nim  $\beta_2$ -sympatomimetika s dlouhým biologickým poločasem, xantiny ve formě retardovaných lékových forem a antileukotrieny, které vykazují zároveň protizánětlivý účinek. (1) (2)

Na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové nyní probíhá výzkum nových potenciálních bronchodilatancií odvozených ze struktury chinazolinových alkaloidů.

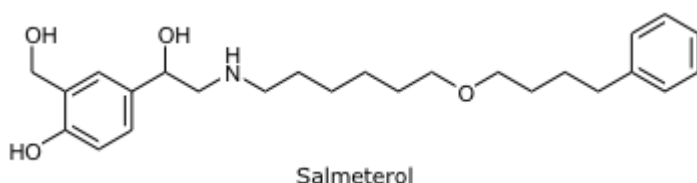
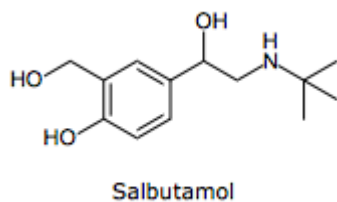
### 2.1.1 $\beta_2$ -sympatomimetika

$\beta_2$ -sympatomimetika aktivují v buňkách enzym adenylátcyklázu a zvyšují přeměnu ATP na cAMP, který ovlivňuje další buněčné pochody. Jejich hlavní terapeutické působení spočívá v bronchodilataci a snížení uvolňování mediátorů ze žírných buněk. Obvykle se podávají inhalačně z důvodu menšího rizika nežádoucích účinků, ale při těžkých akutních stavech se aplikují intravenózně. Struktura  $\beta_2$ -sympatomimetik vychází z isoprenalinu a pro účinek je nezbytná hydroxylová skupina na  $\beta$  uhlíku.



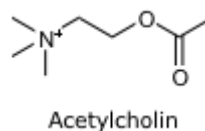
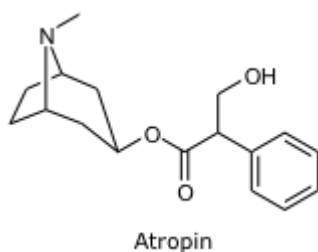
Krátkodobě působící  $\beta_2$ -sympatomimetika se užívají dle potřeby, mají rychlý nástup účinku, který přetrvává 4 – 6 hodin. Do této skupiny patří např.

salbutamol, terbutalin či fenoterol. K dlouhodobě působícím léčivům z této skupiny řadíme mimo jiné salmeterol a formoterol, jejichž účinek trvá přibližně 12 hodin. (1) (3)



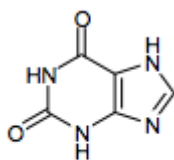
### 2.1.2 Parasympatolytika

Parasympatolytika působí jako antagonisté muskarinových receptorů - brání účinku acetylcholinu, který se podílí na spazmu hladké svaloviny bronchů. Jejich struktura se podobá acetylcholinu a vychází ze struktury atropinu. Jako bronchodilatancia se používají ipratropium a tiotropium. (1) (3) (4)



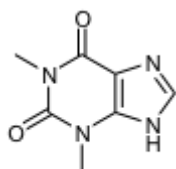
### 2.1.3 Metylchantiny

Deriváty xantinu inhibují fosfodiesterázy a působí jako antagonisté adenosinových receptorů. Jejich účinky jsou psychostimulační, vazodilatační, bronchodilatační a diuretické. K terapii bronchiálního astmatu a CHOPN se používají retardované lékové formy s teofylinem, etofylinem nebo aminofylinem.



Xanthin

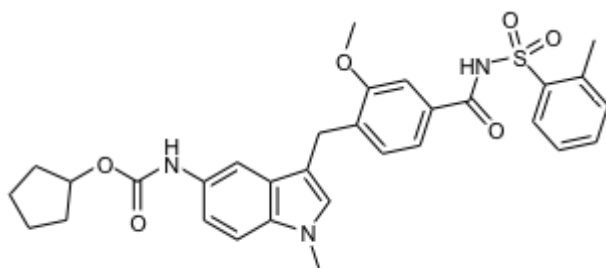
Teofylin působí bronchodilatačně, stimuluje dechové centrum a centrální nervový systém, zvyšuje frekvenci a sílu srdečních kontrakcí a zvyšuje sekreci žaludeční kyseliny. Aminofylin je komplex teofylinu s etylendiaminem, který je ve vodě rozpustnější než samotný teofylin, proto se používá i ve formě roztoků. Podává se perorálně při středně těžkém a těžkém astmatu nebo intravenózně při těžkých astmatických stavech. (1) (4)



Theophyllin

#### 2.1.4 Antileukotrieny

Leukotrieny jsou látky vznikající v organismu z kyseliny arachidonové působením lipooxygenáz. Ve zvýšeném množství se vyskytují u pacientů s bronchiálním astmatem. Způsobují kontrakci hladké bronchiální svaloviny, zvyšují cévní permeabilitu a sekreci hlenu v bronších. Antileukotrieny inhibují syntézu leukotrienů nebo působí jako antagonisté na leukotrienových receptorech. Řadíme k nim např. montelukast nebo zafirlukast, který působí jako kompetitivní antagonist na receptorech pro leukotrieny. Snižuje bronchokonstrikci a alergickou reakci, jeho účinek nastupuje přibližně po dvou hodinách a používá se u těžkých forem astmatu. (1) (2)



Zafirlukast

## 2.2 Chromatografie

Chromatografie patří mezi separační analytické metody, které lze využít při analýze směsí. Během chromatografického procesu dochází k dělení složek mezi stacionární a mobilní fází na základě rozdílných interakcí a můžeme ji použít ke kvalitativní i kvantitativní analýze vzorku.

Chromatografické metody se rozdělují z různých hledisek. Podle charakteru mobilní fáze rozlišujeme plynovou a kapalinovou chromatografii, další hledisko rozděluje chromatografii podle typu separace analyzovaných látek na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou a gelovou. Při adsorpční chromatografii probíhá dělení látek dle jejich adsorpce na povrch stacionární fáze, rozdělovací chromatografie využívá k separaci odlišnou rozpustnost látek ve stacionární a v mobilní fázi, při iontově výměnné chromatografii se látky separují na základě rozdílných elektrostatických přitažlivých sil mezi iontoměniči a ionty vzorku a při gelové chromatografii dochází k oddělení složek podle velikosti částic, kdy menší částice pronikají do pórů stacionární fáze. Posledním způsobem dělení je dle uspořádání stacionární fáze na kolonovou (stacionární fáze je umístěna v koloně) a plošnou (papírová a tenkovrstvá chromatografie). (6) (7)

### 2.2.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie se používá pro analýzu tepelně stálých těkavých látek nebo analytů, které lze převést na těkavé deriváty. Jako mobilní fáze se používá inertní plyn, obvykle dusík nebo helium, do jehož proudu se dávkuje vzorek. Kolony se používají náplňové (ocelové nebo skleněné trubice naplněné granulovaným sorbentem či nosičem pokrytým kapalnou fází) nebo kapilární (jako nosič stacionární fáze slouží vnitřní stěny kapiláry). Nejčastěji používané detektory pro plynovou chromatografii jsou tepelně vodivostní, plamenoionizační a detektor elektronového záchytu. (6) (7)

## 2.2.2 Kapalinová chromatografie

### 2.2.2.1 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie je výhodná pro svoji jednoduchost provedení a využívá se k identifikaci látek a k ověření čistoty. Analýza se provádí nanesením roztoku analyzované látky a roztoku standardu na start chromatogramu. Chromatogram se jedním koncem ponoří do mobilní fáze a před dosažením druhého konce se vyvíjení ukončí. Jako chromatogramy se používají hliníkové folie nebo skleněné desky s naneseným sorbentem, nejčastěji silikagelem nebo oxidem hlinitým. Vrstva sorbentu může obsahovat fluorescenční látku. V takovém případě se detekce provádí pod UV lampou. Pro analýzu se také mohou využít skupinové nebo selektivní barevné reakce, kdy se chromatogram postříká vhodným detekčním činidlem. Při vyhodnocování se porovnávají retenční faktory skvrny analytu a standardu, případně zbarvení skvrn po postřiku detekčním činidlem. (6)

### 2.2.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda, při které dochází k oddělení složek analyzované směsi na koloně naplněné sorbentem. Mezi hlavní přednosti patří rychlost analýzy, možnost automatizace a použití pouze malého množství vzorku.

Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí:

- zásobníku mobilní fáze
- vysokotlakého čerpadla
- směšovače
- dávkovacího zařízení
- kolony
- detektoru
- počítače

Před kolonou může být umístěna předkolona, která zachytává nečistoty a zvyšuje životnost kolony. Nástrík vzorku se provádí ručně nebo pomocí

autosampleru, složení mobilní fáze se může během analýzy měnit nebo zůstává konstantní. Základní kvalitativní charakteristikou je retenční čas, kvantitu vyjadřuje plocha nebo výška píku. (6) (7) (8)

### Kolony

Pro HPLC se používají ocelové nebo skleněné kolony naplněné sorbenty, které jsou ve formě malých pórovitých částic nebo monolitů s velikým povrchem. Stacionární fáze ovlivňuje selektivitu, účinnost a rychlost analýzy a nejčastěji je tvořena silikagelem, na jehož hydroxylových skupinách jsou navázány různé radikály. (6) (7) (8)

### Core-shell kolony

Core-shell kolony jsou naplněny částicemi s pevným jádrem a tenkým pórovitým obalem. V porovnání s kolonami, které jsou vyplněny částicemi o průměru menším než 2  $\mu\text{m}$ , poskytují stejně vysokou účinnost a rychlost analýzy. Zároveň vyvíjejí nižší zpětný tlak, a proto umožňují použít i klasické kapalinové chromatografy. Dalšími výhodami jsou užší píky na výchozích chromatogramech než při použití kolon s plně pórými částicemi. (10)

### Detektory

Detektory zaznamenávají rozdíl při průtoku čisté mobilní fáze a mobilní fáze s analyzovanou látkou detekční celou. Svojí citlivostí a selektivitou ovlivňují výsledek analýzy, přičemž citlivost udává schopnost rozlišit i malé změny v koncentraci analyzované látky a selektivita umožňuje detekovat pouze určité látky.

Mezi nejčastěji používané detektory patří spektrofotometrické detektory, které měří změnu intenzity elektromagnetického záření při průchodu paprsku eluátem. Výsledná absorbance závisí na vlnové délce záření a na chemické struktuře analyzované látky. Mezi spektrofotometrické detektory patří např. UV detektor s fixní vlnovou délkou, UV–VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou a detektor s diodovým polem, který snímá absorpční spektrum a poskytuje trojrozměrný záznam.

Pro látky, které fluoreskují nebo se dají převést na fluoreskující deriváty, se mohou použít fluorescenční detektory, které jsou vysoce citlivé a selektivní. Mezi další používané detektory patří elektrochemický, refraktometrický či hmotnostně spektrometrický. Poslední zmiňovaný využívá ionizaci analyzované látky a následnou separaci nabitých částic podle hmotnosti a náboje. Výhodou tohoto detektoru je vysoká citlivost a selektivita, nevýhodou je jeho finanční náročnost. (6) (7) (8)

#### Stanovení látek vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Ke stanovení analyzovaných látek pomocí HPLC se obvykle používají dvě metody – metoda vnějšího standardu a metoda vnitřního standardu. Při první zmiňované metodě se na kolonu nejprve nastříkne roztok analytu, poté se dávkuje roztok vnějšího standardu. Koncentrace stanovované látky se vypočítá z poměru plochy jejího píku a plochy píku standardu. Pokud stanovení probíhá metodou vnitřního standardu, k roztoku vzorku se přidá známý objem roztoku vnitřního standardu a směs se nastříkuje na kolonu. Koncentrace analyzované látky se spočítá z poměru plochy jejího píku a plochy píku vnitřního standardu. Vnitřní standard se musí eluovat samostatně, nesmí reagovat se zkoušenou látkou a musí být stálý.

Chování chromatografického systému ovlivňuje mnoho faktorů, např. složení mobilní fáze, průtoková rychlost, délka kolony, teplota, tlak a stacionární fáze, proto se před vlastní analýzou provádí test způsobilosti chromatografického systému, který zajišťuje jeho přiměřenou účinnost. Zjišťuje se rozlišení, faktor symetrie, účinnost, kapacitní faktor a relativní retence. (6)



## 2.3 Úprava biologického vzorku před analýzou

Biologické materiály jsou velmi komplikované vzorky a obsahují balastní látky, které mohou interferovat se stanovovanými analyty nebo vést k poškození analytického systému, proto je před vlastním stanovením nutná jejich úprava. K izolaci léčiv a metabolitů se nejčastěji používá extrakce z kapaliny do kapaliny, deproteinace a extrakce na pevnou fázi.

Při extrakci z kapaliny do kapaliny se vzorek smísí s organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou, směs se protřepe, odstředí a oddělí se organické rozpouštědlo. Vzorek se opatrně odpaří a před analýzou se rekonstruuje obvykle v mobilní fázi. Nevýhodou této metody je vysoká spotřeba organických rozpouštědel.

Dalším způsobem úpravy biologického materiálu je deproteinace prováděná přidáním precipitačního činidla, kterým může být silná kyselina, organické rozpouštědlo (např. methanol nebo acetonitril), soli těžkých kovů a další látky. Vzorek se následně protřepe a odstředí. Výhodou deproteinace je jednoduché provedení, mezi nevýhody patří možnost vazby léčiva na precipitát.

Mezi nejčastěji používané metody k úpravě biologických vzorků před HPLC analýzou patří extrakce na pevnou fázi. Principem je interakce analytu mezi sorbentem SPE kolonek a kapalnou fází. Extrakce obvykle probíhá v šesti krocích:

- nejprve je nutné upravit vzorek – odstraňují se pevné nečistoty a tuhé vzorky se převádějí do roztoku
- v dalším kroku se provádí solvatace SPE kolonky, aby sorbent zadržoval analyt; ke smáčení se nejčastěji používá methanol
- poté se kolonka sytí rozpouštědlem analytu k ustavení rovnováhy mezi sorbentem a rozpouštědlem
- následuje aplikace vzorku
- dále se provádí promývání kolonky, kterým se odstraní balastní látky
- v posledním kroku se z kolonky eluuje analyt vhodným rozpouštědlem.

V některých případech se SPE kolonka využívá k zadržování interferujících látek a analyt prochází ven (7) (9) (11)

## 2.4 Validace analytických metod

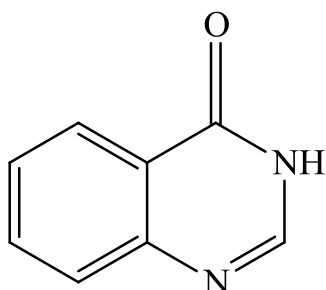
Validace slouží k ověření, že je zvolená metoda vhodná pro stanovení analyzovaných látek. Validace je nutná při vývoji nové nebo při změnách stávající metody, dále se provádí při porovnání dvou metod. Mezi základní parametry validace patří správnost, přesnost, selektivita, citlivost, linearita a robustnost:

- selektivita vyjadřuje schopnost metody rozlišovat analyzovanou látku v přítomnosti dalších složek vzorku
- správnost popisuje, jak moc se shoduje skutečná hodnota s hodnotou získanou
- přesnost udává shodu výsledků při opakovaném měření jednoho vzorku
- citlivost metody se vyjadřuje detekčním a kvantitativním limitem; detekční limit udává nejnižší detekovatelnou koncentraci látky, kvantitativní limit vyjadřuje nejnižší koncentraci látky, kterou je možné stanovit s přijatelnou přesností a správností
- linearita popisuje závislost mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu
- robustnost udává vliv změny podmínek na výsledek analýzy, zjišťuje se např. vliv teploty nebo hodnoty pH mobilní fáze. (6) (12)

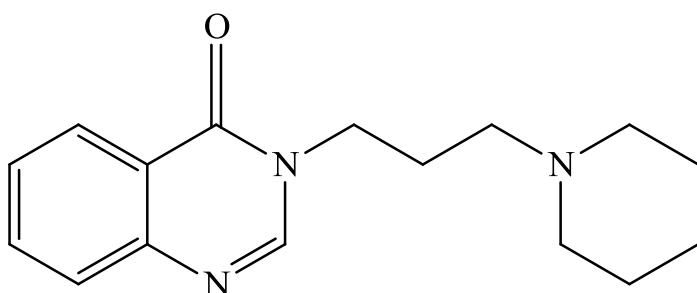
### **3. Experimentální část**

### 3.1 Použité chemikálie

3,4-dihydrochinazolin-4-on - syntetizován na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové, výchozí látka pro syntézu VN O14



3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on – syntetizován na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové



Acetonitril for gradient elution – CHROMASOLV<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich

Amoniak p.a. 25% – Lachema

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. - Penta

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p.a. – LechNer

Kyselina citrónová monohydrát p. a. - Penta

Kyselina fosforečná p.a. 85% - Lachema

Kyselina mravenčí p.a. 99% - Penta

Methanol for gradient elution – CHROMASOLV<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich

Mravenčan amonný 99% - Penta

Potkaní plazma – katedra farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK  
v Hradci Králové

Standardní pufrы TEP Trace pro kalibraci pH metru - WTW

Terc-butylmethylether - LiChrosolv®

Ultračistá voda připravená reverzní osmózou – Farmaceutická fakulta UK  
v Hradci Králové

### **3.2 Použité přístroje**

Analytické váhy - Sartorius

Centrifuga – Hermle Z 100 M

Filtrační zařízení – Supelco

Kapalinový chromatograf Agilent® Series 1200 SL skládající se z vakuového mikrodegaséru, binárního čerpadla 1200 SL, autosampleru 1200 SL plus, termostatu autosampleru, kolonového termostatu TCC Infinity 1290, detektoru s diodovým polem 1200 SL a fluorescenčního detektoru 1200, výsledky byly zaznamenány a zpracovány softwarem Agilent ChemStation, verze B. 04.02..

Kapalinový chromatograf Shimadzu složený z vakuového degasseru GT-154 (Shimadzu), HPLC čerpadla LC-10 ADVP (Shimadzu), nástřikového ventilu RHEODYNE, model 7125 s 20µl nástřikovou smyčkou, UV detektoru LCD 2040 (Laboratorní přístroje Praha), později UV detektoru SPD 20A (Shimadzu), a fluorescenčního detektoru RF-10AXL (Shimadzu), nástřiková smyčka byla plněna skleněnou mikrostříkačkou HAMILTON 50µl, výsledky byly zaznamenány a zpracovány pomocí programu Clarity Lite (Data Apex)

Kolony: Ascentis® Express F5 – Supelco, 2,7 µm, 10 cm x 2,1 mm

Ascentis® Express C18 – Supelco, 2,7 µm, 10 cm x 3 mm

Ascentis® Express Phenyl – Hexyl – Supelco, 2,7  $\mu$ m, 5 cm x 2,1 mm

Ascentis® Express RP – Amide – Supelco, 2,7  $\mu$ m, 10 cm x 3 mm

pH – metr - inoLab 720 - WTW

Třepačka – Lab dancer - IKA

Visiprep vacuum manifold Supelco, olejová vývěva Siemens, kolonky HybridSPE®-Phospholipid Supelco

### **3.3 Příprava roztoků**

#### Příprava roztoků stanovovaných látek

Navážku příslušné sloučeniny jsem rozpustila v 10 ml methanolu. Vzniklé roztoky jsem dále dle potřeby ředila.

#### Příprava fosfátového pufru o pH=3,0

1,70 g dihydrogenfosforečnanu draselného jsem rozpustila ve 450ml ultračisté vody. Přidáním kyseliny fosforečné jsem upravila pH na požadovanou hodnotu. Roztok jsem přefiltrovala filtračním zařízením a doplnila objem na 500 ml.

#### Příprava fosfátového pufru o pH=7,0

2,68 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného jsem rozpustila ve 450ml ultračisté vody, pH jsem upravila přidáním kyseliny fosforečné na hodnotu 7,0. Roztok jsem přefiltrovala filtračním zařízením a doplnila objem na 500ml.

### Příprava 0,03 mol/l roztoku kyseliny mravenčí

565 µl kyseliny mravenčí jsem doplnila ultračistou vodou na objem 500 ml.

### Úprava biologického materiálu

Potkaní plazmu jsem upravovala několika způsoby, abych našla nejvhodnější způsob pro danou analýzu.

1. K plazmě jsem přidala 1% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu v poměru 1:3 k vysrážení proteinů, směs jsem nejprve minutu třepala, poté ji dala na 2 minuty do centrifugy. Oddělený supernatant jsem podrobila SPE na kolonkách HybridSPE®-Phospholipid – vzorek jsem přenesla do kolonky umístěné na vakuovém manifoldu, zapnula jsem olejovou vývěvu k vytvoření vakua a přibližně po 2 minutách jsem odebrala výsledný eluent. Tento postup jsem vyzkoušela i s dalšími precipitačními činidly – s 1% roztokem mravenčanu amonného v methanolu a 0,5% roztokem kyseliny citrónové v acetonitrilu.
2. Ke 100 µl plazmy v Eppendorfově zkumavce jsem přidala 10 µl 25% roztoku amoniaku a 300 µl *tert*-butylmethyletheru. Směs jsem minutu třepala a na dobu tří minut vložila do centrifugy. Následně jsem odebrala vrchní organickou fázi, kterou jsem odpařila. Po odpaření jsem provedla rekonstituci ve 300 µl mobilní fáze.

### **3.4 Použité mobilní fáze**

Ascentis® Express F5

voda/acetonitril 50/50, 75/25

0,03 mol/l HCOOH/ACN 50/50, 75/25

fosfátový pufr pH 3,0/ACN 50/50, 60/40, 70/30, 85/15

fosfátový pufr pH 3,0/methanol 50/50, 70/30, 75/25, 90/10

fosfátový pufr pH 7,0/ACN 50/50, 70/30

Ascentis® Express C18

voda/ACN: 50/50, 70/30

fosfátový pufr pH 3,0/ACN: 50/50, 70/30

Ascentis® Express Phenyl – Hexyl

voda/ACN: 50/50

0,03 mol/l HCOOH/ACN: 50/50, 70/30

0,03 mol/l HCOOH/methanol: 50/50, 70/30

fosfátový pufr pH 3,0/methanol: 50/50, 70/30

fosfátový pufr pH 3,0/ACN: 50/50, 70/30

fosfátový pufr pH 7,0/ACN: 50/50, 70/30

fosfátový pufr pH 7,0/methanol: 50/50, 70/30

Ascentis® Express RP–Amide

voda/ACN: 70/30

fosfátový pufr pH 7,0/ACN: 70/30

0,03 mol/l HCOOH/methanol: 70/30, 80/20, 85/15, 87/13, 88/12,  
90/10



## **4. Výsledky**

Všechny experimenty probíhaly za laboratorní teploty. Při detekci UV detektorem byla vlnová délka nastavena na hodnotu 230 nm. Chromatogramy č. 1 – 8 byly pořízeny na kapalinovém chromatografu Shimadzu, chromatogramy č. 9 a 10 na přístroji Agilent® Series 1200 SL.

#### 4.1 Kolona Ascentis® Express F5

Nejprve jsem testovala kolonu Ascentis® Express F5, na kterou jsem nastříkovala 10 µl roztoku příslušné látky. Rychlost průtoku jsem nastavila na 0,5 ml/min, detekce byla prováděna UV detektorem. Vyzkoušela jsem pět směsí mobilních fází v různých poměrech. U většiny testovaných mobilních fází byl retenční čas téměř shodný s mrtvým retenčním časem a výsledné píky měly nevhodný tvar, pouze směs pufru o pH=3,0 a methanolu vypadala nadějně. Nakonec jsem tuto kolonu pro danou analýzu neshledala vhodnou z důvodu podobných retenčních časů obou testovaných látek.

V tabulkách 1 a 2 jsou shrnuty retenční časy analyzovaných látek při použití mobilní fáze tvořené směsí pufru o pH=3,0 a methanolu. Na obrázcích 1 a 2 jsou výsledné chromatogramy při použití dvou rozdílných mobilních fází.

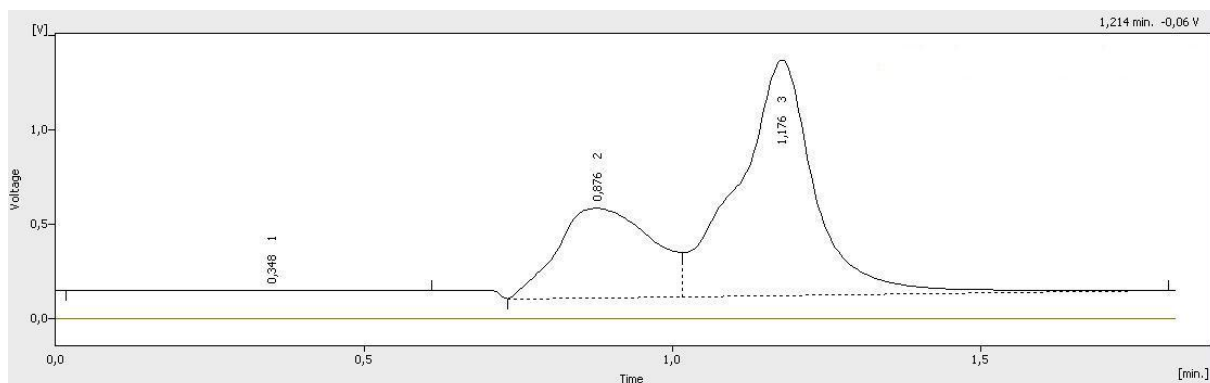
Tab. 1: Retenční časy 4-OH-Q při použití mobilní fáze složené z pufru o pH=3,0 a methanolu

Poměr mobilní fáze pufr pH 3,0/MeOH	Retenční čas [min]
70/30	4,14
75/25	5,40
90/10	16,63

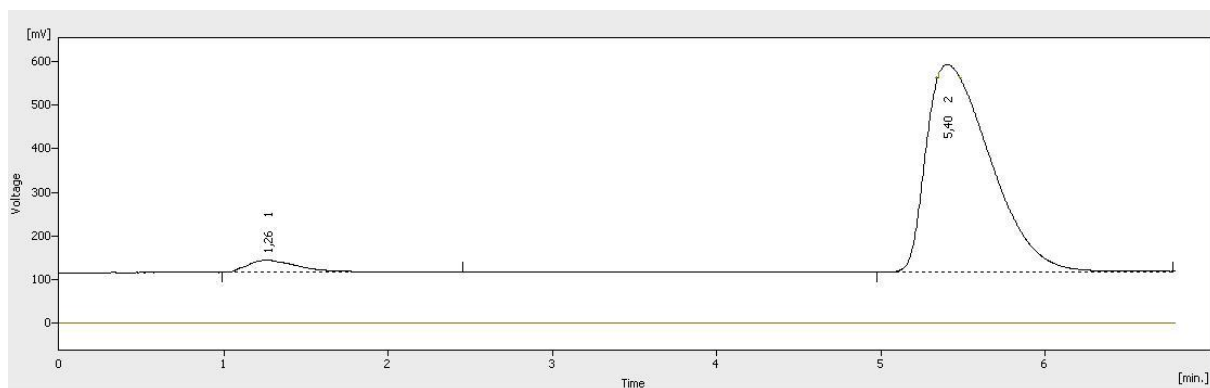
Tab. 2: Retenční časy VN 014 při použití mobilní fáze složené z pufru o pH=3,0 a methanolu

Poměr mobilní fáze pufr pH 3,0/MeOH	Retenční čas [min]
70/30	4,18
75/25	5,47
90/10	16,52

Obr. 1: Chromatogram 4-OH-Q při použití mobilní fáze složené z pufru o pH=3,0 a ACN v poměru 70/30



Obr. 2: Chromatogram 4-OH-Q při použití mobilní fáze složené z pufru o pH=3,0 a MeOH v poměru 75/25



## 4.2 Kolona Ascentis® Express C18

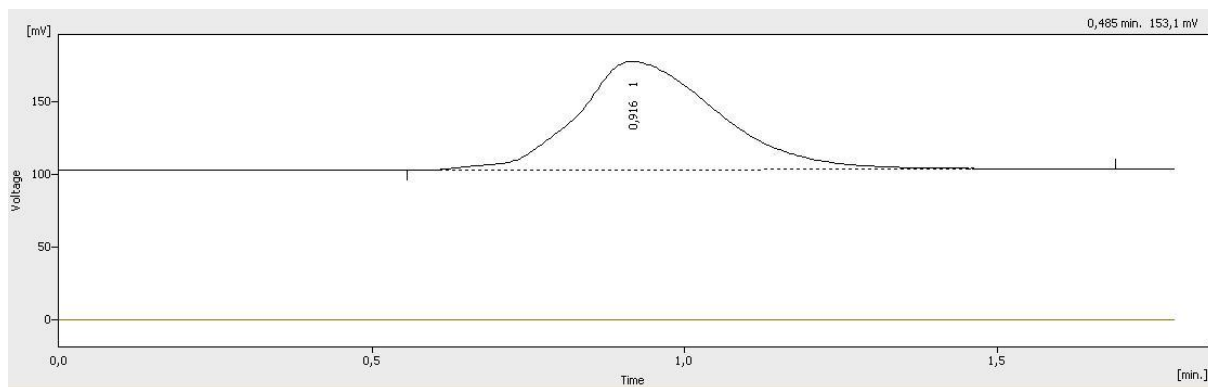
Další testovanou kolonou byla kolona Ascentis® Express C18. Nastříkovala jsem 10 µl roztoku 4-OH-Q, průtok byl nastaven na 0,5 ml/min, detekce probíhala UV detektorem. Analyzovaná látka byla na koloně málo zadržována, proto jsem tuto kolonu nezvolila k dalším pokusům.

V tabulce 3 jsou uvedeny retenční časy 4-OH-Q, na obrázku 3 je výsledný chromatogram analýzy při použití mobilní fáze skládající se z pufru o pH=7,0 a ACN v poměru 50/50.

Tab. 3: Retenční časy 4-OH-Q [min]

	50/50	70/30
H <sub>2</sub> O/ACN	1,11	1,30
Pufr pH 7,0/ACN	0,92	1,27

Obr. 3: Chromatogram 4-OH-Q při použití mobilní fáze složené z pufru o pH=7,0 a ACN v poměru 50/50



### 4.3 Kolona Ascentis® Express Phenyl–Hexyl

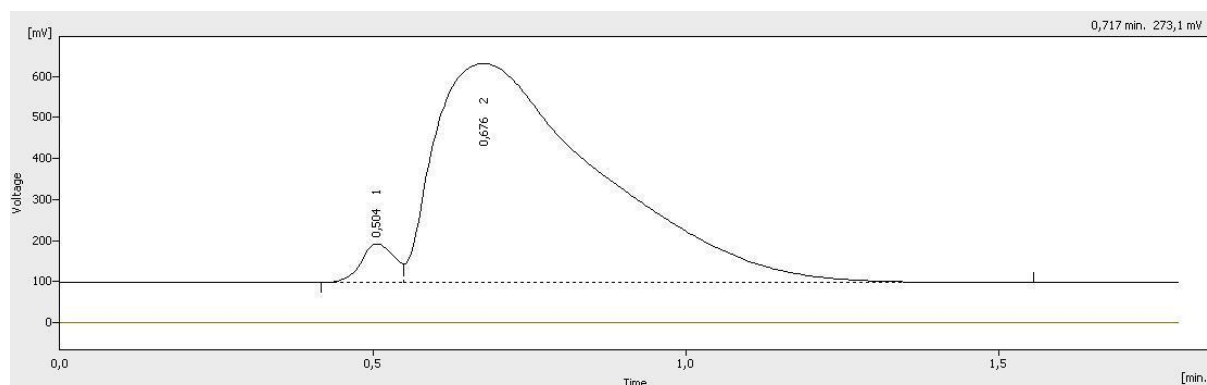
Na této koloně jsem vyzkoušela sedm různých mobilních fází, detekce probíhala UV detektorem, průtok byl nastaven nejprve na 0,5 ml/min, poté na 0,7 ml/min, nastříkala jsem 10 µl roztoku 4-OH-Q. Z důvodu malého zadržování látky na koloně a nevhodného tvaru výsledných píků nebyla tato kolona pro danou analýzu vhodná.

V tabulce 4 jsou shrnuty retenční časy 4-OH-Q. Na obrázku 4 je chromatogram získaný při použití mobilní fáze složené z 0,03 mol/l roztoku kyseliny mravenčí a methanolu v poměru 50/50 a na obrázku 5 je výsledný chromatogram při použití mobilní fáze tvořené pufrům o pH=3,0 a ACN v poměru 70/30.

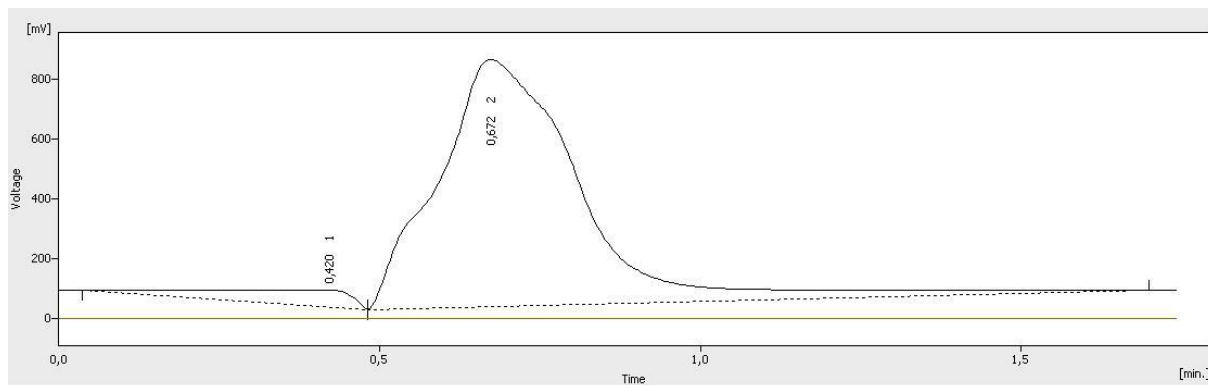
Tab. 4: Retenční časy 4-OH-Q [min] při průtoku 0,7 ml/min

	50/50	70/30
0,03 mol/l HCOOH/ACN	0,59	0,68
0,03 mol/l HCOOH/MeOH	0,68	1,22
Pufr pH 3,0/MeOH	0,65	1,26
Pufr pH 3,0/ACN	0,59	0,67
Pufr pH 7,0/MeOH	0,69	1,34
Pufr pH 7,0/ACN	0,59	0,67

Obr. 4: Chromatogram 4-OH-Q při použití mobilní fáze složené z 0,03 mol/l roztoku HCOOH a MeOH v poměru 50/50, průtok byl nastaven na 0,7 ml/min



Obr. 5: Chromatogram 4-OH-Q při použití mobilní fáze složené z pufru o pH=3,0 a ACN v poměru 70/30, průtok byl nastaven na 0,7 ml/min



#### **4.4 Kolona Ascentis® Express RP–Amide**

Poslední testovanou kolonou byla kolona Ascentis® Express RP–Amide, na které jsem dosáhla nejlepších výsledků. Detekce probíhala UV detektorem a fluorescenčním detektorem nejprve s nastavenou excitační vlnovou délkou 266 nm a emisní vlnovou délkou 289 nm. Po přeměření absorpčních a fluorescenčních spekter roztoků analytů v mobilní fázi jsem upravila excitační vlnovou délku na 265 nm a emisní vlnovou délku na 335 nm. V experimentech jsem zkoušela měnit rychlost průtoku a množství nastříkovaného vzorku.

Na koloně RP-Amide jsem nejprve vyzkoušela mobilní fáze složené z vody a acetonitrilu, z pufru o pH=7,0 a acetonitrilu a z pufru o pH=7,0 a methanolu. Při použití těchto mobilních fází docházelo k malému zadržování obou testovaných látek na koloně a ke štěpení píků. K dalším pokusům jsem zvolila mobilní fázi tvořenou 0,03 mol/l roztokem kyseliny mravenčí a methanolem v různých poměrech. Při poměru 70/30 byla látka VN 014 stále málo zadržována na koloně, ale při zvýšení podílu 0,03 mol/l roztoku kyseliny mravenčí došlo ke zlepšení výsledků.

V tabulkách 5 a 6 jsou shrnuty retenční časy 4-OH-Q a VN 014 při použití mobilní fáze složené z 0,03 mol/l roztoku kyseliny mravenčí a methanolu v různých poměrech. Detekce probíhala UV detektorem, průtok byl nastaven na 0,5 ml/min a nastříkováno bylo 10 $\mu$ l vzorku. Zvyšování podílu roztoku kyseliny mravenčí vedlo k prodloužení retenčních časů analyzovaných látek.

Tab. 5: Retenční časy 4-OH-Q, mobilní fáze byla tvořena směsí 0,03 mol/l roztoku kyseliny mravenčí a MeOH, rychlost průtoku byla 0,5 ml/min

Poměr mobilní fáze 0,03 mol/l HCOOH/MeOH	Retenční čas [min]
70/30	2,54
80/20	4,04
87/13	6,76
90/10	8,16

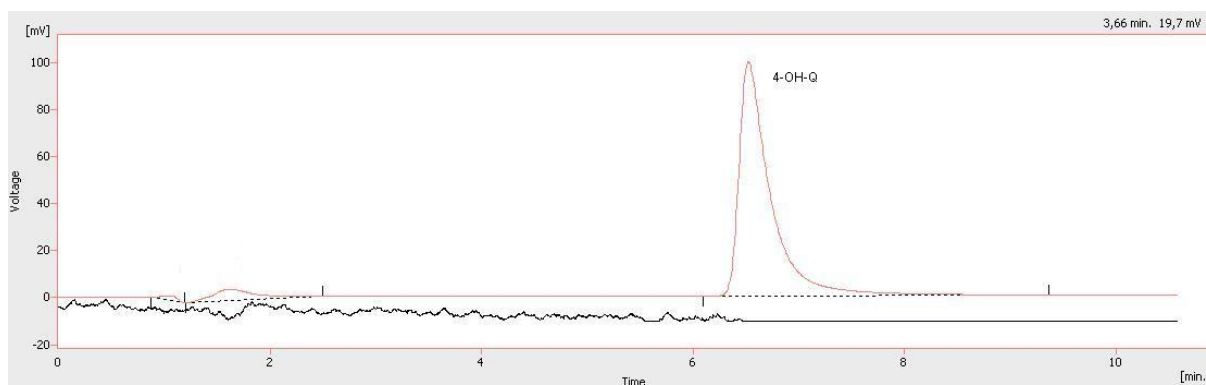
Tab. 6: Retenční časy VN 014, mobilní fáze byla tvořena směsí 0,03 mol/l roztoku kyseliny mravenčí a MeOH, rychlost průtoku byla 0,5 ml/min

Poměr mobilní fáze 0,03 mol/l HCOOH/MeOH	Retenční čas [min]
70/30	1,71
80/20	2,21
87/13	4,60
90/10	6,22



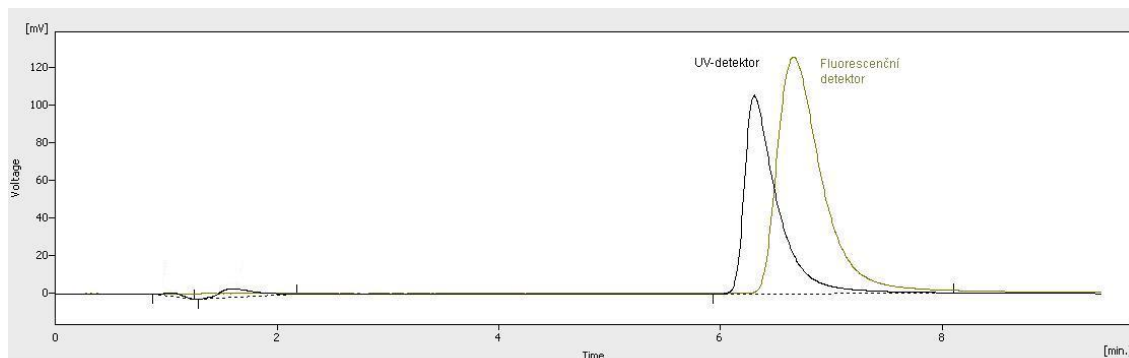
Na obrázku 6 je výsledný chromatogram látky 4-OH-Q. Pro analýzu jsem použila mobilní fázi tvořenou 0,03 mol/l roztokem kyseliny mravenčí a methanolem v poměru 87/13, rychlost průtoku byla nastavena na 0,5 ml/min, na kolonu jsem nastříkala 10  $\mu$ l roztoku. Detekce probíhala UV detektorem a fluorescenčním detektorem s nastavenou excitační vlnovou délkou 266 nm a emisní vlnovou délkou 289 nm. Fluorescenční detektor při těchto vlnových délkách nezaznamenal analyzovanou látku, což bylo pravděpodobně způsobeno tím, že při měření absorpčních spekter nebyla analyzovaná látka rozpuštěná v použité mobilní fázi, ale pouze v methanolu.

Obr. 6: Chromatogram 4-OH-Q při použití mobilní fáze složené z 0,03 mol/l roztoku HCOOH a MeOH v poměru 87/13, průtok byl nastaven na 0,5 ml/min



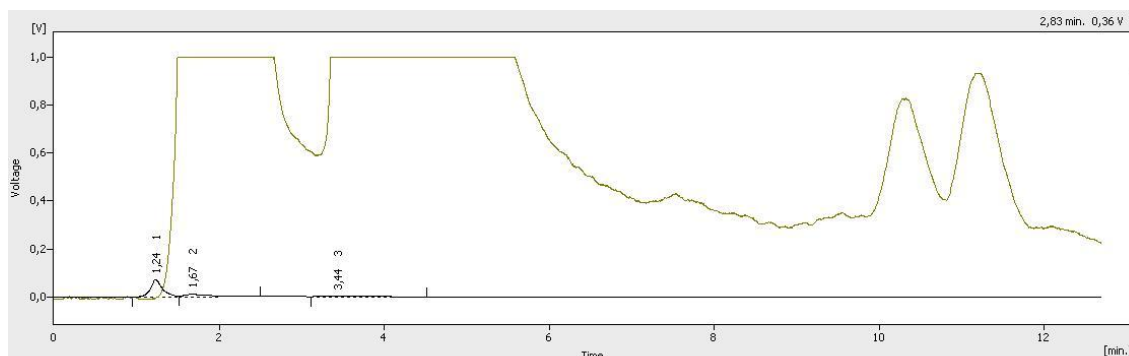
Po přeměření absorpčních a fluorescenčních spekter roztoků analytů v mobilní fázi tvořené 0,03 mol/l roztokem kyseliny mravenčí a methanolem jsem excitační vlnovou délku upravila na hodnotu 265 nm a emisní vlnovou délku na 335 nm. Tyto vlnové délky jsem použila při všech následujících měřeních. Detekce UV detektorem probíhala opět při vlnové délce 230 nm a nastříkováno bylo 50  $\mu$ l roztoku. Na obrázku 7 je již patrná odezva obou detektorů.

Obr. 7: Chromatogram 4-OH-Q při použití mobilní fáze složené z 0,03 mol/l roztoku HCOOH a MeOH v poměru 87/13, rychlost průtoku byla 0,5 ml/min



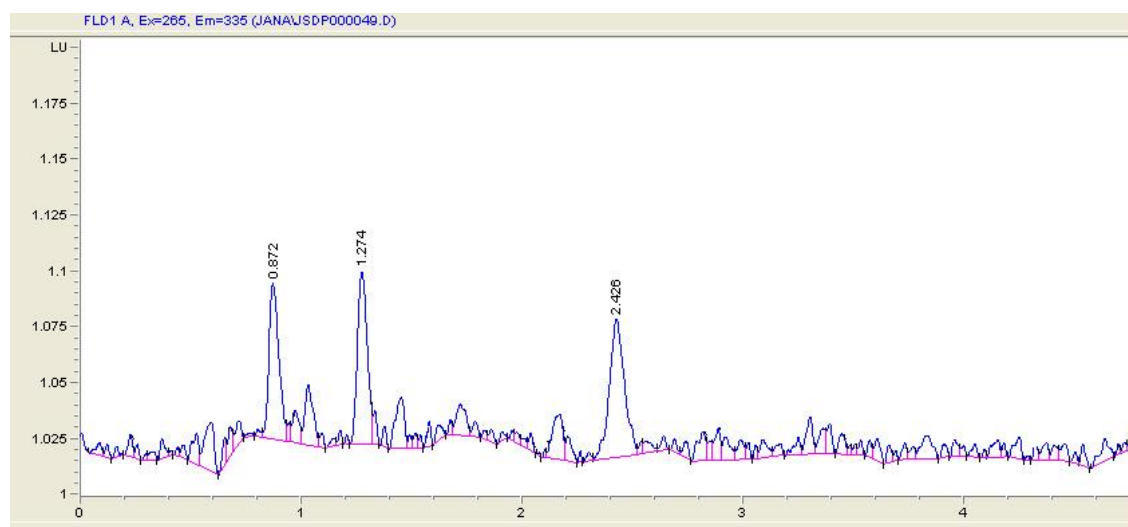
Na koloně RP–Amide jsem také prováděla analýzu biologického vzorku, který jsem zkoušela upravovat několika způsoby. K tomuto testování byla jako vzorek použita potkaní plazma. Nejprve jsem testovala úpravu vzorku pomocí HybridSPE®-Phospholipid kolonek. Přitom jsem k vysrážení bílkovin obsažených v plazmě vyzkoušela různá precipitační činidla: 1% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu, 1% roztok mravenčanu amonného v methanolu a 0,5% roztok kyseliny citrónové v acetonitrilu. Ani jedno ze tří zmíněných činidel se pro danou analýzu neosvědčilo, protože ve vzorku zůstávala rezidua, jejichž retenční časy byly podobné retenčním časům analyzovaných látek. Na obrázku 8 je výsledný chromatogram plazmy při použití SPE a předchozího vysrážení bílkovin roztokem mravenčanu amonného v methanolu. Na tomto chromatogramu odpovídá černá křivka odezvě UV detektoru, odezva fluorescenčního detektoru je znázorněna zelenohnědou barvou.

Obr. 8: Chromatogram plazmy zpracované před HPLC na kolonkách HybridSPE®-Phospholipid, mobilní fázi tvořil 0,03 mol/l roztok HCOOH a MeOH v poměru 87/13, průtok byl nastaven na 0,5 ml/min



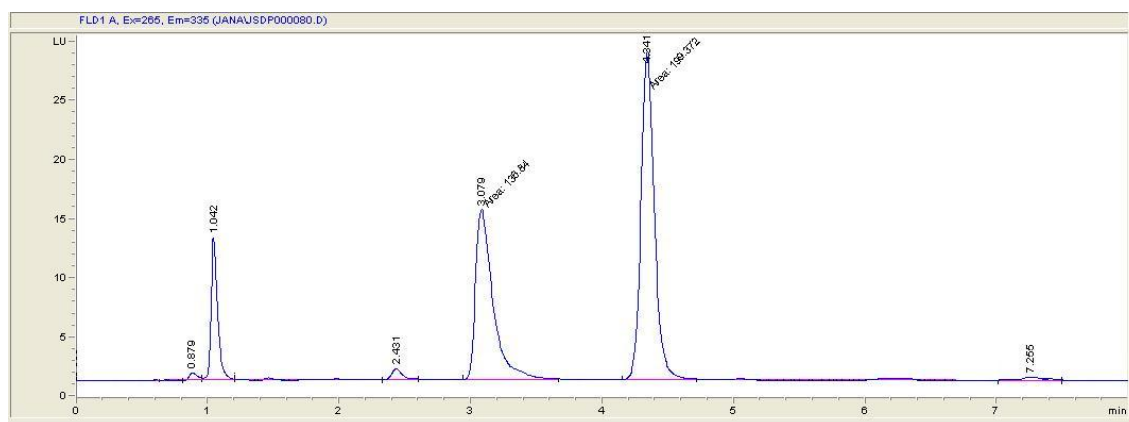
Z výše uvedených důvodů jsem změnila metodu a použila LLE, při níž byl extrakčním činidlem *tert*-butylmethylether. Postup je popsán v experimentální části. Ve vzorku sice stále zůstávala rezidua, ale jejich retenční časy se lišily od retenčních časů zkoumaných látek. Chromatogram takto extrahovaného biologického vzorku je na obrázku 9, detekce probíhala fluorescenčním detektorem.

Obr. 9: Chromatogram plazmy zpracované před HPLC metodou LLE, mobilní fáze byla tvořená 0,03 mol/l roztokem HCOOH a MeOH v poměru 88/12, průtok byl nastaven na 0,850 ml/min



Následně jsem vyzkoušela analýzu biologického materiálu, který obsahoval zkoumané látky. Vzorek jsem připravila přidáním roztoků VN 014 a 4-OH-Q k plazmě a protřepáním na laboratorní třepačce. Provedla jsem LLE a pro analýzu jsem použila mobilní fázi tvořenou 0,03 mol/l roztokem kyseliny mravenčí a methanolem v poměru 88:12, průtok byl nastaven na 0,850 ml/min, na kolonu jsem nastříkovala 30 $\mu$ l vzorku. Detekce probíhala fluorescenčním detektorem. Látka VN 014 se eluovala v čase 3,08 min, retenční čas 4-OH-Q měl hodnotu 4,34 min. Příslušný chromatogram je na obrázku 10.

Obr. 10: Chromatogram VN 014 a 4-OH-Q v plazmě při použití mobilní fáze složené z 0,03 mol/l roztoku HCOOH a MeOH v poměru 88:12, rychlost průtoku byla 0,850 ml/min



## 4.5 Validace

### Selektivita

Selektivita použité metody byla dokázána při nástřiku slepého vzorku. Žádná látka obsažená v plazmě se neeluovala ve stejném retenčním čase jako zkoumané látky (viz obr. 9).

### Detekční a kvantitativní limit

Z chromatogramu slepého vzorku jsem vypočítala detekční limit jako trojnásobek šumu pozadí a kvantitativní limit jako jeho desetinásobek. Pro látku VN 014 jsem získala hodnoty  $LOD = 0,04 \mu\text{g/ml}$ ,  $LOQ = 0,12 \mu\text{g/ml}$ .

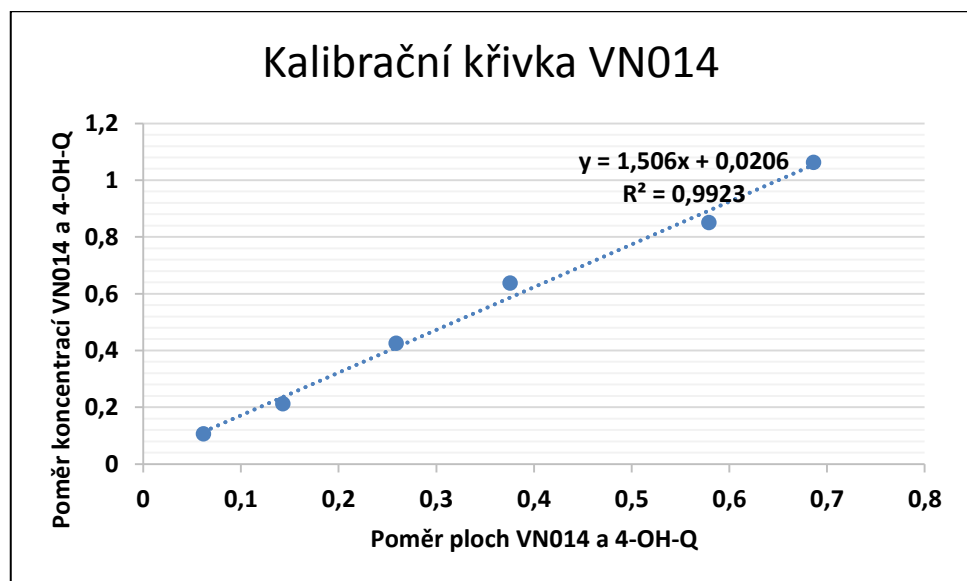
### Kalibrační závislost

Připravila jsem šest vzorků s různou koncentrací VN 014 v plazmě. Ke každému vzorku jsem přidala 1  $\mu\text{l}$  4-OH-Q a následně provedla úpravu metodou LLE popsanou v experimentální části. Vzorky jsem opakovaně nástřikovala na kolonu. V tabulce 7 jsou uvedeny výsledné plochy píků a jejich průměrné hodnoty a koncentrace látek VN 14 a 4-OH-Q. Výsledná kalibrační přímka je na obrázku 14.

Tab. 7: Údaje pro sestavení kalibrační přímky

VN014 c (µg/ml)	4-OH-Q c (µg/ml)	VN014 plocha	VN014 plocha-průměr	4-OH-Q plocha	4-OH-Q plocha-průměr
1,7	1,6	141,2	136,8	206,1	199,35
1,7	1,6	132,4		192,6	
1,36	1,6	109,6	102	180,4	176,15
1,36	1,6	94,4		171,9	
1,02	1,6	71,8	69,55	188,5	185,1
1,02	1,6	67,3		181,7	
0,68	1,6	42	38,55	146,2	148,75
0,68	1,6	35,1		151,3	
0,34	1,6	23,6	21,95	151,7	153,6
0,34	1,6	20,3		155,5	
0,17	1,6	9,5	9,1	151,1	147,55
0,17	1,6	8,7		144	

Obr. 11: Kalibrační přímka pro VN 014 při použití 4-OH-Q jako vnitřního standardu



## **5. Diskuze**

Cílem mé diplomové práce bylo najít vhodné podmínky pro HPLC stanovení látky VN 014 v biologickém materiálu. K experimentům jsem použila čtyři typy core-shell kolon.

První testovanou kolonou byla kolona Ascentis® Express F5. Při použití mobilních fází voda/acetonitril, 0,03 mol/l HCOOH/ACN, fosfátový pufr pH 3,0/ACN a fosfátový pufr pH 7,0/ACN byl retenční čas analyzované látky téměř shodný s mrtvým retenčním časem, navíc měly výsledné píky nevhodný tvar. Lepších výsledků bylo dosaženo s mobilní fází složené z fosfátového pufru pH 3,0 a methanolu. Látka VN 014 však eluovala v podobném čase jako látka 4-OH-Q, která je výchozí sloučeninou pro syntézu látky VN 014 a kterou jsem použila jako vnitřní standard (Tab. 1, 2).

Následující experimenty jsem prováděla na koloně Ascentis® Express C18 s použitím dvou mobilních fází - voda/ACN a fosfátový pufr pH 3,0/ACN. Z důvodu malého zadržování analyzované látky na koloně jsem tuto kolonu nepoužila pro další pokusy (Tab. 3).

Třetí testovanou kolonou byla kolona Ascentis® Express Phenyl-Hexyl. Vyzkoušela jsem sedm různých mobilních fází - voda/ACN, 0,03 mol/l HCOOH/ACN, 0,03 mol/l HCOOH/MeOH, fosfátový pufr pH 3,0/MeOH, fosfátový pufr pH 3,0/ACN, fosfátový pufr pH 7,0/ACN a fosfátový pufr pH 7,0/MeOH. I na této koloně byla testovaná látka málo zadržována, proto jsem ji neshledala vhodnou pro danou analýzu (Tab. 4).

Poslední testovanou kolonou byla kolona Ascentis® Express RP-Amide, na které jsem dosáhla nejlepších výsledků. Ze tří mobilních fází, které jsem použila, se osvědčila mobilní fáze složená z 0,03 mol/l HCOOH a methanolu v poměru 87/13. Analyzované látky se eluovaly v rozdílném čase a chromatografické píky měly nejvhodnější tvar ze všech testovaných kolon (Tab. 5, 6; Obr. 6). Při použití mobilních fází voda/ACN a fosfátový pufr pH 7,0/ACN docházelo k malému zadržování analytů na koloně a ke štěpení píků. Na této koloně jsem také s úspěchem vyzkoušela fluorescenční detekci s excitační vlnovou délkou 265 nm a emisní vlnovou délkou 335 nm (Obr. 7).



Skutečnost, že zatímco kolona Ascentis® Express C18 neposkytla dobré výsledky, na koloně Ascentis® Express RP–Amide byly pokusy o separaci studovaných látek úspěšné, může vypadat nepochopitelně, protože obě stacionární fáze jsou tvořeny dlouhými alifatickými řetězci. Avšak výpočet provedený Belešovou (15) podle Snyderova modelu (16) ukazuje, že tyto dvě kolony jsou ortogonální. To znamená, že jejich separační vlastnosti se významně liší, což moje výsledky potvrzují.

Z výše uvedených informací vyplývá, že je pro danou analýzu nejvhodnější kolona Ascentis® Express RP–Amide s mobilní fází tvořenou 0,03 mol/l HCOOH a methanolem. Při analýze biologického vzorku jsem upravila poměr 0,03 mol/l HCOOH/MeOH na 88/12 a zvýšila rychlost průtoku mobilní fáze z původních 0,5 ml/min na 0,850 ml/min, čímž se zvýšila i rychlost analýzy. Výhodou core-shell kolon oproti klasickým kolonám je, že takovéto zvýšení průtoku nemá zásadní vliv na separaci látek. To je způsobeno příznivějším průběhem van Deemterovy křivky (17)

Vzorky krevní plazmy jsem nejprve upravovala pomocí HybridSPE®-Phospholipid kolonek, kdy jsem k vysrážení bílkovin plazmy postupně použila tři různá precipitační činidla (1% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu, 1% roztok mravenčanu amonného v methanolu a 0,5% roztok kyseliny citrónové v acetonitrilu). Ve vzorku však stále zůstávala rezidua, která rušila výsledek analýzy (Obr. 8). Z tohoto důvodu jsem vyzkoušela metodu LLE s extrakčním činidlem *tert*-butylmethyletherem. Při použití této metody se žádná rezidua neeluovala v podobném čase jako analyzované látky (Obr. 9, 10).

Výsledky pokusů s HybridSPE®-Phospholipid kolonkami jsou zklamáním. Přesto, že tyto kolony jsou určeny pro úpravu plazmatických vzorků pro LC-MS, nepředpokládala jsem, že v případě fluorescenční detekce je vůbec nebude možné použít.

Na závěr jsem metodu validovala (12) určením selektivity, citlivosti a kalibrační závislosti. Selektivitu jsem prokázala při nástřiku slepého vzorku, ve kterém se žádná látka neeluovala ve stejném čase jako zkoumané látky. Z chromatogramu slepého vzorku jsem také vypočítala hodnoty detekčního a kvantitativního limitu pro látku VN 014 (LOD = 0,04 µg/ml, LOQ = 0,12 µg/ml).

Pro určení kalibrační závislosti jsem použila metodu vnitřního standardu. Kalibrační křivka vyjadřuje závislost poměru ploch píků stanovované látky a vnitřního standardu na poměru jejich koncentrací (Tab. 7, Obr. 11).

## **6.Závěr**

Ve své práci jsem hledala vhodné podmínky pro HPLC stanovení látky VN 014. Jako vnitřní standard jsem použila látku 4-OH-Q, která je výchozí sloučeninou pro syntézu VN 014.

Vyzkoušela jsem čtyři typy core-shell kolon. Při použití kolony Ascentis® Express F5 měly obě látky podobný retenční čas, na kolonách Ascentis® Express C18 a Ascentis® Express Phenyl-Hexyl byly testované látky málo zadržovány. Nejlepších výsledků jsem dosáhla na koloně Ascentis® Express RP-Amide při použití mobilní fáze složené z 0,03 mol/l roztoku kyseliny mravenčí a methanolu v poměru 88:12. Detekce probíhala UV-detektorem a nastavenou vlnovou délkou 230 nm a fluorescenčním detektorem s excitační vlnovou délkou 265 nm a emisní vlnovou délkou 335 nm.

Dalším cílem mé práce bylo najít optimální úpravu biologického vzorku před HPLC analýzou. Při použití metody SPE v plazmě zůstávala rezidua, která narušovala výsledek analýzy. Proto jsem použila metodu LLE s extrakčním činidlem *tert*-butylmethyletherem. Použitou metodu jsem validovala stanovením selektivity, detekčního a kvantitativního limitu a sestrojením kalibrační křivky.

## **7. Seznam použitých zkratek**

4-OH-Q - 3,4-dihydrochinazolin-4-on

ACN - acetonitril

ATP – adenosintrifosfát

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

HCOOH – kyselina mravenčí

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

CHOPN – chronická obstrukční plicní nemoc

LC – MS – kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

LLE – Liquid-Liquid Extraction (extrakce z kapaliny do kapaliny)

LOD – detekční limit

LOQ – kvantitativní limit

MeOH - methanol

SPE – Solid Phase Extraction (extrakce na pevných fázích)

VN 014 - 3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on

## **8. Použitá literatura**

1. Lincová D., Farghali H., et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, 2. vydání, Galén, Praha 2007
2. <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2011/04/06.pdf> Václav špičák: Farmakoterapie průduškového astmatu, únor 2014
3. Doležal M., Opletalová V., Miletín M., Zimčík P., Kučerová M.: Farmaceutická chemie léčiv autonomního nervového systému, Karolinum, Praha 2009
4. <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2006/02/08.pdf> Viktor Kašák: Farmakoterapie stabilizované chronické obstrukční plicní nemoci v České republice, únor 2014
6. Klimeš J. a kol.: Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, Hradec Králové, Nucleus HK 2011
7. Klouda P.: Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003
8. Nováková L., Douša M. a kol.: Moderní HPLC separace I., Praha 2013
9. Nováková L., Douša M. a kol.: Moderní HPLC separace II., Praha 2013
10. [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com), leden 2014
11. <http://www.sigmaaldrich.com>, leden 2014
12. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001; <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
13. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, leden 2014
14. <http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=PharmaWiki>, únor 2014
15. Belešová M.: Rigorózní práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2013
16. Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch, J.L.: Practical HPLC Method Development. 2nd ed., John Wiley & Son, New York, 1997
17. Carr P. W., Xiaoli Wang: Anal. Chem. 81 (2009), 5342-5353
18. Gritti F., Cavazzini A., Marchetti N., Guiochon G.: J. Chromatogr. A 1157 (2007), 289-303